

利用 RAPD 标记分析濒危植物白豆杉种群的遗传结构

王 艇¹, 苏应娟^{2,*}, 欧阳蒲月², 黄宏文¹, 陈春泉³, 曾祥铭³,
丁炳扬⁴, 金孝锋⁴, 胡绍庆⁵

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中山大学生命科学院, 广州 510275; 3. 井冈山自然保护区, 井冈山 343600;

4. 浙江大学生命科学院, 杭州 310029; 5. 杭州植物园, 杭州 310013)

摘要:以我国特有的濒危裸子植物白豆杉为材料, 采用 RAPD 标记对其分布于浙江、江西、湖南和广西的 11 个天然种群予以检测, 通过贝叶斯法估测了种群的遗传分化程度, 并和由其他算法得出的结果进行了比较。求出的 θ^B (Hickory)、 G_{ST} (Nei) 及 Φ_{ST} (AMOVA) 值分别为 0.5018、0.5865 和 0.5436; 而经由 Shannon 指数计算出的种群间遗传多样性所占比例为 0.4839, 同贝叶斯法估计出的结果最为接近。和其他松杉类植物相比, 白豆杉种群间发生了极其显著的遗传分化, 这可能是因为: (1) 种群长期处于星散分布状态; (2) 雌雄异株, 而生于林下的雌株经常不能正常受粉; (3) 种群取样跨越的地理范围宽广。Mantel 检验表明, 种群间的遗传分化程度和地理距离之间显著相关 ($r = 0.719$, $P = 0.003$)。此外还发现白豆杉的遗传变异水平偏低, 推测瓶颈效应和遗传漂变对小种群的作用是造成这一后果的重要因素。对白豆杉种群的保育和管理提出了建议。

关键词: 白豆杉; RAPD 显性标记; 贝叶斯分析; 种群遗传分化; 保育策略

文章编号: 1000-0933(2006)07-2313-09 中图分类号: Q234, Q941 文献标识码: A

Using RAPD markers to detect the population genetic structure of *Pseudotaxus chienii* (Taxaceae), an endangered and endemic conifer in China

WANG Ting¹, SU Ying-Juan^{2,*}, OUYANG Pu-Yue², HUANG Hong-Wen¹, CHEN Chun-Quan³, ZENG Xiang-Ming³,
DING Bing-Yang⁴, JIN Xiao-Feng⁴, HU Shao-Qing⁵ (1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;
2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 3. Jinggangshan Natural Reserve, Jinggangshan 343600, China; 4. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 5. Hangzhou Botanical Garden, Hangzhou 310013, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7): 2313 ~ 2321.

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers are a useful tool for plant population genetic studies. However, as these markers are dominant, heterozygotes and homozygotes for a particular locus are indistinguishable as they will produce a band of similar amplification intensity. This makes it impossible to calculate allelic frequencies directly from RAPD profile data and limited their usefulness in the survey of genetic differentiation among plant populations. To obviate this problem, a Bayesian hierarchical model was presented in terms of the classical F -statistics for partitioning genetic diversity as assessed with dominant markers; and, through the use of Markov chain Monte Carlo (MCMC) simulation, the posterior distribution of θ^B , an analogue to F_{ST} , can be numerically approximated. *Pseudotaxus chienii* (Taxaceae) is an endangered conifer endemic to China. In this research, 11 of its relictual populations located in Zhejiang, Jiangxi, Hunan and Guangxi provinces were examined using RAPD markers. The degree of genetic differentiation among these populations was estimated by Bayesian approaches and several

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270153); 中国科学院“百人计划”资助项目 (05052903)

收稿日期: 2005-08-13; 修订日期: 2006-03-10

作者简介: 王艇 (1969 ~), 男, 山西晋城人, 博士, 研究员, 主要从事植物进化遗传学研究. E-mail: tingwang@wbgcas.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Ls97@zsu.edu.cn

Foundation item: The project was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30270153); the “100 Talent Project” of Chinese Academy of Sciences (No. 05052903)

Received date: 2005-08-13; **Accepted date:** 2006-03-10

Biography: WANG Ting, Ph. D., Professor, mainly engaged in plant evolutionary genetics. E-mail: tingwang@wbgcas.cn

conventional methods as well. With a burn-in of 50000 iterations and sampling run of 250000 iterations from which every 50th sample is retained for posterior calculations, the estimate for θ^B was obtained as 0.5018 and its 95% credible interval is [0.4672, 0.5322]. The G_{ST} and Φ_{ST} values are 0.5865 and 0.5436, respectively. Interestingly, when using Shannon's index of phenetic diversity to quantify and further partition the amount of genetic diversity, it was found that 48.39% of the total genetic diversity occurred among populations, very close to the θ^B estimate. Comparison with the estimates based on RAPD analyses of other conifer species indicated that a significantly high degree of genetic differentiation occurred among populations of *P. chienii*, possibly because: (1) its natural distribution has long been restricted in disjunct isolates characteristic of a fragmented population; (2) the species is dioecious, tending to grow under dense canopy, which hinders the female cone from being pollinated; and (3) the sample collection covers almost the entire range of the species, a large geographical distance. Mantel test showed that the degree of population genetic differentiation is significantly related with geographic distance ($r = 0.719$, $P = 0.003$). In addition, a low level of RAPD variation was revealed within *P. chienii*. We propose that the low amount of genetic variation is the result of bottleneck effects as well as genetic drift from small population size. In terms of the above results, the development of conservation strategies for *P. chienii* was discussed.

Key words: *Pseudotaxus chienii*; RAPD dominant markers; Bayesian approaches; population genetic differentiation; conservation strategies

随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术现已被广泛应用于进化群体遗传学研究。它不仅方法简便、成本较低、无需预先知道所研究物种的序列信息,而且还能够检测到丰富的多态性^[1,2]。对于珍稀濒危物种的研究 RAPD 还具有有一些潜在优势,例如,实验所需的组织、细胞材料少,不至于对个体造成伤害。但是,RAPD 用于种群遗传分析时也存在明显的弱点。最突出的是,RAPD 作为一种显性分子标记,二倍体个体中只要存在一份序列拷贝就可得到扩增产物,因此无法区分杂合体和纯合体,不能从带型数据直接估算等位基因频率^[3]。针对 RAPD 作为显性标记在统计分析方面带来的困难,有些学者提出了解决方法。Stewart 和 Excoffier^[3]对处于 Hardy-Weinberg 平衡的种群和有一定程度近交但基因型近交比例已达到平衡的种群这两种情形,分别建立起由 RAPD 谱带表型数据求算个体间 RAPD 座位差异期望值的方法;通过计算该期望值来替代计算多基因座位向量间的距离实现了在分子方差分析(AMOVA)框架内利用分子表型数据估算种群遗传结构。但是,Hardy-Weinberg 平衡和种群内繁育状况已知这些假设条件限制了上述方法的广泛应用,因为不少种群(尤其是植物种群)个体数有限、属非随机交配,而且对于它们的近交系数(Inbreeding coefficient)完全缺乏了解。为了更好地回避这些假设,Holsinger 等^[4,5]采用贝叶斯统计思路,以 Wright^[6]和 Malécot^[7]定义的 F 统计量为基础,将种群内繁育程度不明所产生的效应整合进了概率分布模型,构建出对显性标记数据进行分级结构(Hierarchical structure)分析的方法。模拟结果显示,即便是在检测位点和取样种群数目都相对较小的情况下,仍能估算出准确的 F_{ST} 值^[4,5]。

白豆杉(*Pseudotaxus chienii* (Cheng) Cheng)为常绿灌木或小乔木,高达 4m,雌雄异株,种子成熟时肉质杯状假种皮呈白色,染色体数目 $2n = 24$;是我国特有裸子植物^[8]。分类上,白豆杉被单独处理成白豆杉属(*Pseudotaxus* Cheng),归在红豆杉科(Taxaceae)^[8]。白豆杉在浙江南部、江西西南部、湖南南部和西北部、广西北部以及广东北部均有分布^[8],生长在海拔 800 ~ 1 500 m,地势高峻的陡坡、沟谷两侧或悬岩上。由于其天然种群数量已十分有限,现被列为国家二级保护珍稀植物^[9,10]。

对生命周期长、远交为主、风媒传粉和借风力散播种子的木本植物研究发现,其遗传变异主要分配在种群内,种群间遗传分化一般比草本植物低^[11]。但这些研究多是以广布木本植物为对象,而对星散分布的木本植物的报道还相对较少。另外,白豆杉种群长期呈现不连续分布格局,具有“古稀有种”特征,故而有可能形成独特的种群遗传结构^[12]。结合这些问题,本研究运用 RAPD 技术通过贝叶斯统计分析对白豆杉天然种群的遗传结构与分化进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

样本分别采自浙江、江西、湖南和广西等省的 11 个天然种群(表 1)。植株生长于山地沟谷两侧、陡坡密林下或悬岩上,海拔高度 900~1 400 m。样本数总计 91 株,随机选取样本时,样本间距离至少保持 10 m。采集的叶片材料立即用硅胶干燥、贮藏,运抵实验室后-20℃保存。

表 1 白豆杉种群的取样地点

Table 1 Origin locations of sampled populations of <i>P. chienii</i>				
区域 Provenance	种群地点与代号* Population location and code	地理坐标 Geographical coordinate	海拔(m) Altitude	样本数 Sample size
浙江 Zhejiang	遂昌柘岱口大西坑中坑(ZJa)	118°45'E 28°15'N	1000	7
	衢江坑口乡下呈村巨龙顶(ZJb)	118°56'E 28°43'N	870	8
	衢江坑口乡下呈村巨龙顶(ZJc)	118°56'E 28°43'N	950	8
	衢江坑口乡下呈村双岗口(ZJd)	118°57'E 28°43'N	830	8
	衢江坑口乡下呈村大源尾(ZJe)	118°57'E 28°43'N	1100	8
	龙泉凤阳山水口(ZJf)	119°10'E 27°52'N	1100	10
	龙泉凤阳山老鹰岩(ZJg)	119°11'E 27°52'N	1100	10
江西 Jiangxi	井冈山笔架山(JXh)	114° 10'E 26° 35'N	1350	10
	井冈山轿子山(JXi)	114° 10'E 26° 35'N	950	2
湖南 Hunan	张家界森林公园天子山(HNj)	109°30'E 28°50'N	1050	10
广西 Guangxi	武鸣大明山(GXk)	107° 33'E 22° 36'N	1250	10

* 下同 the same below

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 采用改进的十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)法^[13]。测定紫外光吸收以确定 DNA 浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。

1.2.2 引物的筛选 从上海生工公司合成的 100 个 10 碱基随机寡核苷酸引物中筛选出 20 个扩增产物稳定、重复性好的引物(表 2)对所有样本的基因组 DNA 进行扩增。

1.2.3 RAPD 扩增与检测 经预实验优化条件后确定反应体系为:总体积 25μl,其中 10×PCR 缓冲液(500mmol/L KCl,100mmol/L Tris-HCl,1.0% Triton X-100,20mmol/L MgCl₂) 2.5μl,引物 0.3μl (1.5μmol/L),

dNTP 0.5μl (0.2mmol/L),模板 1μl(70ng),Taq 酶 0.5μl(0.5U),反应混合物用 20μl 石蜡油覆盖。扩增条件:94℃200s 预变性;94℃ 30s,36℃ 30s,72℃ 60s,40 个循环;72℃延伸 10min。所有反应在 PTC-100TM Peltier Thermal Cycler(美国 MJ 公司)上进行。扩增产物经 1.4%的琼脂糖凝胶电泳检测,254nm 紫外灯下观察、照像。

1.3 数据分析

1.3.1 多态位点比率 在某一特定位点上,若扩增片段出现的频率小于 0.99,则此位点称为多态位点。多态位点比率即在所有检测位点中多态位点所占的比例。

1.3.2 Shannon 表型多样性指数 利用 Shannon 表型多样性指数计算种群内和种群间的遗传多样性,计算公式为:

$$H = \sum \pi_i \ln \pi_i$$

式中, π_i 为表型频率,即某一扩增带在第 i 个种群中出现的频率。

1.3.3 贝叶斯统计分析 采用 Holsinger 等^[5,14]建立的方法,其中 f 和 θ^B 分别对应于 F 统计量中的 F_{IS} 和 F_{ST} 。

表 2 用于 RAPD 分析的随机引物及序列

Table 2 Random oligonucleotide primers and sequences for RAPD analysis

引物 Primers	序列 (5'→3') Sequences (5'→3')	引物 Primers	序列 (5'→3') Sequences (5'→3')
S77	TTCC CCCC AG	S430	ACAA CTGG GG
S85	CTGA GACG GA	S456	TCGG CGGT TC
S182	CCTC TGAC TG	S471	AACG CGTC GG
S188	TTCA GGGT GG	S504	CCCG TAGC AC
S224	CCCC TCAG GG	S506	GTCT ACGG CA
S310	CCCT AGAC TG	S1026	TGCC GCAC TT
S346	TCGT TCCG CA	S1226	GGCG CGTT AG
S397	AGCC TGAG CC	S2002	TGCT CGGC TC
S404	GGCG GTTG TC	S2028	TCGT CGAA GG
S429	TGCC GGCT TG	S2079	GGTT CCTC TC

样本包括来自 K 个种群 I 个座位的数据;每个座位具有 $A1$ 和 $A2$ 两种等位基因, $A1$ 对 $A2$ 为显性;参数的条件概率分布由下式给出:

$$P(f, \theta^B, p, \pi \mid N_{A1} N_{A2}) \propto \left(\prod_{i=1}^I \left(\prod_{k=1}^K \gamma_{A1,ik}^{N_{A1,ik}} \gamma_{A2,ik}^{N_{A2,ik}} P(r_{ik} \mid \pi_i, \theta^B, f) \right) P(\pi_i) \right) P(\theta^B) P(f)$$

式中, $\gamma_{A1,ik}$ 和 $\gamma_{A2,ik}$ 分别为种群 k 中座位 i 上显性表型和隐性表型的频率, $N_{A1,ik}$ 和 $N_{A2,ik}$ 分别为种群 k 中座位 i 上显性表型和隐性表型的数目, $P(f)$ 和 $P(\theta^B)$ 为 f 和 θ^B 的先验分布, $P(\pi_i)$ 为每个座位上等位基因平均数的先验分布, $P(\gamma_{ik} \mid \pi_i, \theta^B, f)$ 为推导出的每个种群表型频率的先验概率。通过运行 Hickory v1.0 软件^[5,15], 采用马尔科夫链的蒙特卡罗(Markov chain Monte Carlo, MCMC)法数值逼近 f 和 θ^B 的后验概率。本研究采用摒弃起始的 50000 个样本(burin-in: 50000)、迭代运行 250000 次(sample: 250000)、每 50 次后验计算保存一次样本(thin: 50)的条件对 f 和 θ^B 作点估计并求得估计参数的 95% 置信区间。

1.3.4 利用 PopGen32 软件^[16] 计算观测等位基因数、有效等位基因数、基因分化指数、种群内和种群间的基因多样性。选用 Arlequin 2.0 软件^[17] 计算出欧式距离平方矩阵, 并以此作为输入文件进行分子方差分析(AMOVA); 同样使用该软件通过 Mantel 检测确定种群间的 θ^B 估计值和地理距离之间的相关性。

1.3.5 采用 UPGMA 法对 Jaccard 相似性系数进行聚类分析。对表型数据矩阵应用 NTSYSpc2 软件^[18] 进行主成分分析(PCA)。

2 结果

2.1 白豆杉种群的遗传变异

进行 RAPD 分析时, 引物扩增出的结果会因研究植物的不同而有差异。针对白豆杉, 首先进行预实验, 从 100 个 10 碱基随机引物中筛选出 20 个能获得清晰带型且可重复性好的引物(表 2)。在随后的研究中, 只利用这 20 个引物的扩增结果构建数据矩阵和进行统计分析。

20 个引物对白豆杉 11 个种群共计 91 个体的 DNA 样品进行扩增, 得到 264 条条带, 大小介于 300 至 2000bp 之间。每个引物扩增出的条带数介于 5 至 22 之间, 平均每个引物扩增出 13.20 条带。每个引物均能检测到多态位点, 多态位点百分率为 76.14%。

线形回归分析显示多态位点数、多态位点比率、观察等位基因数、有效等位基因数、基因多样性及 Shannon 指数等概要性统计结果和种群大小、种群分布海拔高度之间均无相关性。地区水平上, 上述统计指数一致显示: 种群的遗传多样性水平浙江最高, 广西次之, 江西第三, 而湖南最低(表 3)。

表 3 用 20 个 RAPD 随机引物检测白豆杉种群所得到的统计结果

Table 3 Summary statistics revealed by using 20 RAPD random primers to detect populations of *P. chienii*

种群 Population	位点数 Num of loci	多态位点数 Num of polymorphic loci	多态位点比率 Percentage of polymorphic loci	观察等位基因数 Observed num of alleles	有效等位基因数 Effective num of alleles	Nei 基因多样性 Nei's gene diversity	Shannon 指数 Shannon's index
ZJa	205	65	0.3171	1.3171	1.1984	0.1149	0.1324
ZJb	208	72	0.3462	1.3462	1.2165	0.1239	0.1315
ZJc	214	75	0.3505	1.3551	1.1889	0.1121	0.1454
ZJd	202	75	0.3713	1.3713	1.2373	0.1351	0.1370
ZJe	202	70	0.3465	1.3465	1.2055	0.1188	0.1267
ZJf	194	61	0.3144	1.3144	1.1964	0.1132	0.1176
ZJg	200	74	0.3700	1.3700	1.2384	0.1356	0.1282
Zhejiang Total	233	137	0.5880	1.5923	1.3196	0.1881	0.1867
JXh	198	62	0.3131	1.3131	1.1938	0.1109	0.1146
JXi	187	19	0.1016	1.1016	1.0718	0.0421	0.0508
Jiangxi Total	204	72	0.3529	1.3529	1.2114	0.1224	0.1251
HNj	199	46	0.2312	1.2312	1.1394	0.0810	0.0899
GXk	219	98	0.4475	1.4475	1.2464	0.1449	0.1665
总计 Total	264	201	0.7614	1.7652	1.3998	0.2367	0.2362

2.2 白豆杉种群的遗传分化

由于对白豆杉天然种群的内繁育状况还完全缺乏了解, 所以进行贝叶斯分析时, 选择参数为(1,1)的 β -

分布作为 f 的先验分布,亦即不赋予其先验概率任何信息。这样在 `burn-in: 50000`、`sample: 250000` 以及 `thin: 50` 的 MCMC 运行条件下,基于白豆杉 264 个座位组成的数据实行数值逼近后得到的后验概率分布和取样描记线见图 1。描记线记录显示,取样过程覆盖了全部参数空间。求出的 f 估计值 $\hat{f} = 0.5087$, 95% 置信区间为 $[0.0275, 0.9735]$; θ^B 估计值 $\hat{\theta}^B = 0.5018$, 95% 置信区间为 $[0.4672, 0.5322]$; 偏差信息检验 (Deviance Information Criterion, DIC) 取值为 3714.6567。事实上,如果改用 `burn-in: 5000`、`sample: 25000` 及 `thin: 5` 的条件也可以获得极为相近的结果: $\hat{f} = 0.4946$, 95% 置信区间为 $[0.0225, 0.9722]$; $\hat{\theta}^B = 0.5004$, 95% 置信区间为 $[0.4656, 0.5322]$; DIC = 3709.8248。两种设置条件下得到的结果反映出所运行的马尔科夫链能很好地收敛于平稳分布; $\hat{f}$ 的置信区间都比 $\hat{\theta}^B$ 的宽得多,表明 Holsinger 等^[5,14] 所建立的模型对 θ^B 的估计比对 f 更精准。

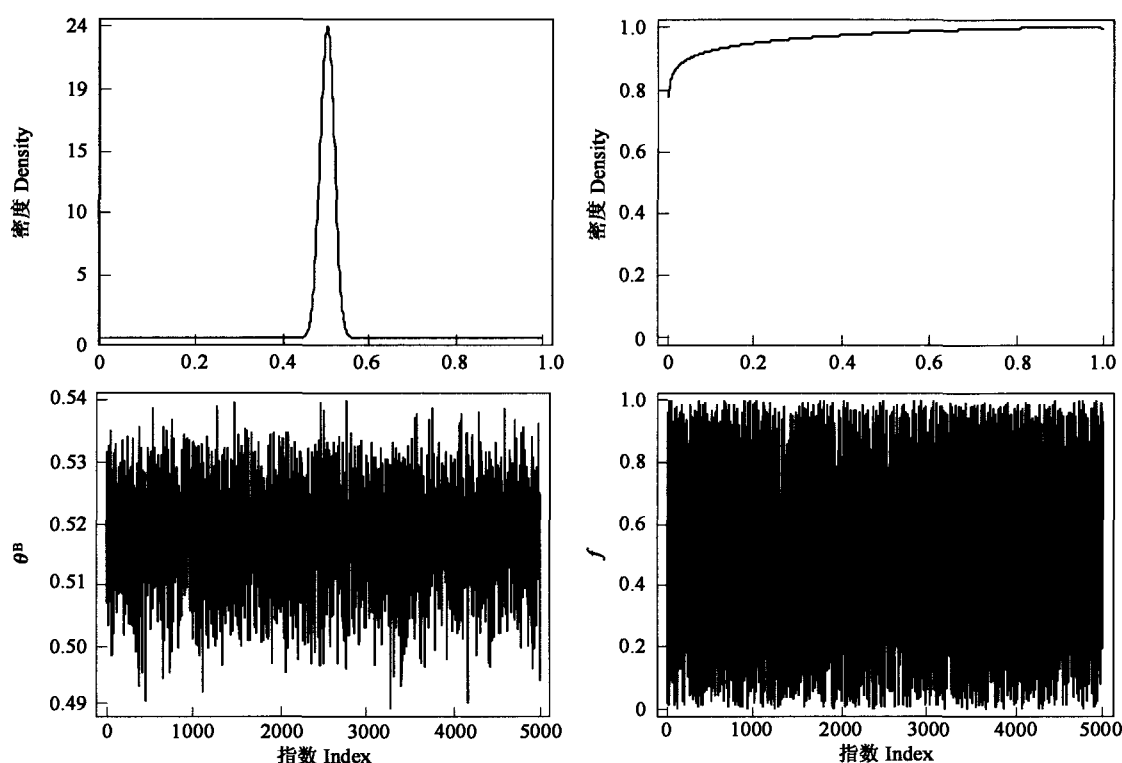


图 1 由 RAPD 数据估算出的 θ^B 和 f 后验概率分布和取样描记线

Fig. 1 Posterior distribution and sample traces for θ^B and f estimated from the RAPD data

另外,同样在 `burn-in: 50000`、`sample: 250000` 以及 `thin: 50` 运行条件下,如果将 f 值设为 0,那么 DIC 取值为 3781.4330。这同 f 从先验概率分布随机取值时所得到的 DIC 值 3714.6567 相差 66 单位以上,提示种群内的基因型频率明显偏离 Hardy-Weinberg 平衡下的预期值^[15]。

利用相同的白豆杉 RAPD 数据矩阵计算出的 Nei 基因分化系数 G_{ST} 值^[19] 为 0.5865, AMOVA 得到的 Φ_{ST} 值为 0.5436 ($P < 0.001$), 通过 Shannon 表型多样性指数求出的种群间遗传多样性所占比例 $[(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}]$ 为 0.4839。

此外,白豆杉种群间的 $\hat{\theta}^B$ 值和地理距离间具显著相关性 ($r = 0.719$, $P = 0.003$), 符合 Wright 的“距离决定隔离 (Isolation by distance)”模型^[20]。

2.3 聚类 and 主成分分析

合并 20 个随机引物的扩增结果发现, 91 个被检测个体的 RAPD 带型各不相同。利用 UPGMA 法基于 Jaccard 相似性系数对所有个体进行聚类分析发现: 来自浙江、江西、广西和湖南的种群各自构成独立分支; 其中分布于浙江的种群进一步分为两个分支, 一个分支包括 ZJa、ZJb、ZJc 和 ZJd, 而另一分支包括 ZJe、ZJf 和 ZJg

(图 2)。对 RAPD 谱带表型数据进行主成分分析(PCA)获得的个体间相似性格局同样支持浙江、江西、广西和湖南种群各自组成独立群(图 3);提取的前 3 个主成分 PC1、PC2 及 PC3 分别代表着 36.78%、24.29% 和 15.53%(共计 76.60%)的方差。聚类和主成分分析均检测到个体聚类和它们的地理来源间存在明显关联,来自不同省份的个体未出现混合分布或重叠现象(图 2,3)。

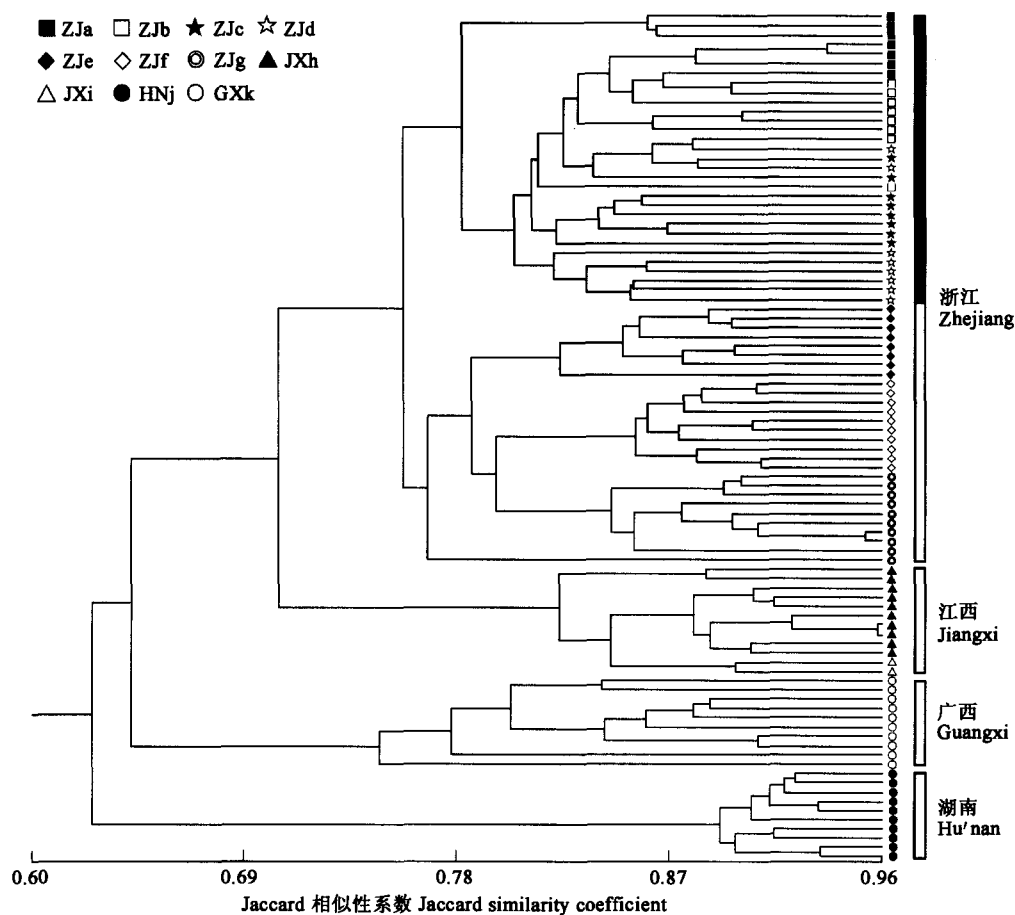


图 2 个体间 Jaccard 相似性系数经 UPGMA 法获得的树系图

Fig.2 Dendrogram established from Jaccard similarity coefficient between individuals by UPGMA method

3 讨论

在 Wright^[20-22]建立的 F_{IS} , F_{IT} 及 F_{ST} 等 F 统计量基础上, Nei^[19] 进一步发展出 J_S , J_T 及 G_{ST} 统计量用于分析分化种群的遗传多样性在亚种群内和亚种群间的分配。Nei 的方法仍是通过等位基因频率来测度种群的遗传变异,但在两个方面作了改进:(1)Wright 的 F 统计量仅适用于每个座位只有两种等位基因的情形,而 Nei 的方法无需考虑每个座位上等位基因的数目;(2)Nei 的方法不再需要顾及突变、选择和迁移这些进化动力的样式。然而,需要指出的是,在每个基因座位只存在两种等位基因时,其实 F_{ST} 和 G_{ST} 是对等的^[19]。因此,当将 RAPD 标记视为基因座位在进行分析时,无论是应用 Nei 的 G_{ST} 或是 Wright 的 F_{ST} 其实并无区别。Stewart 和 Excoffier^[3] 计算 Φ_{ST} 值的方法依据 AMOVA 途径。本研究由白豆杉种群 RAPD 数据计算出的 G_{ST} 值为 0.5865、 Φ_{ST} 值为 0.5436,同经贝叶斯法估算出的 θ^B 值 0.5018 差别较大,这一方面是因为无法从 RAPD 谱带数据准确估算出等位基因频率,另一方面是由于缺乏白豆杉近交系数的信息,不能将计算过程予以校正。将 RAPD 谱带统计结果视作表型数据处理,经由 Shannon 指数计算出的种群间遗传多样性所占比例为 0.4839,这同 θ^B 的估计值 $\hat{\theta}^B$ 最为接近,考虑到 $\hat{\theta}^B$ 的 95% 置信区间为 [0.4656, 0.5322],统计学上表明两者之间并无根本差异。对兰科植物 *Platanthera leucophaea* RAPD 数据进行的贝叶斯估计和 Shannon 指数分析得到相似结果^[5]。这暗

示,在对物种的近交缺乏了解的情况下,把 RAPD 结果当作表型数据看待,采用 Shannon 指数来测度种群的遗传变异和分级结构不失为一种可被接受的途径。在研究植物种群遗传变异时,Dawson 等^[23]和 Meekins 等^[24]也都曾报道过 Shannon 指数对显性标记因不能直接测度杂合体而导致的偏差并不敏感。

和其他松杉类植物使用 RAPD 标记检测到的种群遗传分化结果相比——例如,大叶南洋杉(*Araucaria bidwillii*, $\Phi_{ST} = 0.3771$)^[25]、智利南洋杉(*Araucaria araucana*, $\Phi_{ST} = 0.128$)^[26]、黑云杉(*Picea mariana*, 未根据取样大小校正的 $F_{ST} = 0.053$, 校正后的 $F_{ST} = 0.027$)^[27]、扭叶松(*Pinus contorta*, $G_{ST} = 0.162$)^[28]、北美短叶松(*Pinus banksiana*, $G_{ST} = 0.155$)^[30]、卵果松(*Pinus oocarpa*, $G_{ST} = 0.112$)^[29]、皮尔格柏(*Pilgerodendron wifurum*, $\Phi_{ST} = 0.1855$, $G_{ST} = 0.159$)^[30]、智利柏(*Fitzroya cupressoides*, $\Phi_{ST} = 0.1438$)^[31]、*Podocarpus salignus* ($\Phi_{ST} = 0.070$)^[32]以及欧洲红豆杉(*Taxus baccata*, $\Phi_{ST} = 0.1803$)^[33]——白豆杉种群间发生了极其显著的遗传分化($\theta^B = 0.5018$, $G_{ST} = 0.5865$, $\Phi_{ST} = 0.5436$)。这提示,和广布的木本植物不同,星散分布的木本植物可以形成高度分化的种群遗传结构。白豆杉属第三纪孑遗植物;据叶绿体 *matK* 基因序列数据推测的结果,它可能早在距今 1.43 ~ 1.71 亿年前的侏罗纪中晚期即已出现^[34]。白豆杉孑遗种群的大小介于几株至 300 余株不等,地理上相距 2 ~ 1400km;多数种群不仅个体稀少,而且分布位置彼此隔离。尽管近些年来的人为活动进一步加剧了白豆杉部分种群的片段化,但事实上白豆杉作为“古稀有种”,在种群历史上它曾长期处于星散分布状态。由于遗传漂变的作用能使种群的固定指数每代增加 $1/2N_e$ (N_e 为有效种群大小)^[35],所以白豆杉悠长的进化史、较低的 N_e 和长期种群间隔离应该是导致种群间发生高度遗传分化的重要因素。另外,白豆杉雌雄异株,特别是生于林下的雌株往往不能正常受粉,相当于雌株数目减少,从而进一步减低 N_e (因为 $N_e = 4N_mN_f/(N_m + N_f)$, N_m 和 N_f 分别为种群中雄、雌株的数目^[35]),增加种群间的分化。

Mantel 检验表明白豆杉种群间的遗传分化程度和地理距离之间显著相关($r = 0.719$, $P = 0.003$)。在本研究中,白豆杉种群的取样跨越了最高达 1400km 的地理范围,这可直接解释为何在种群间检测到高度的遗传分化。Nybom 和 Bartish^[36]对发表的利用 RAPD 技术分析植物种群遗传变异式样的结果进行了总结,他们注意到种群间的地理距离和分化程度通常呈正相关;并且认为,和等位酶相比,由于 RAPD 标记可以检测到更多位点,因而更加符合“距离决定隔离(Isolation by distance)”模型的理论预期^[36]。基于 RAPD 表型数据进行的 UPGMA 聚类分析还显示,来自浙江、江西、广西和湖南的种群各自组成独立群。在聚类图中,除 ZJa、ZJb、ZJc 和 ZJd 4 个种群外,取自同一地点的种群的所有个体聚合于相同分支,不同种群的个体在分支式样上不出现混合分布的现象。这些结果表明,对于地理上相距较远的白豆杉种群,种群间缺乏个体迁移。据报道,红豆杉类植物通常风媒传粉、种子借助鸟类或小型动物传播^[37]。可是,这些生物学性质显然未能使白豆杉跨越远距离地理阻隔,实现种群间的基因流,因而成为加剧种群间遗传分化的另一原因。

根据已报道的一些松柏类植物遗传多样性的 RAPD 分析结果,诸如,大叶南洋杉(*Araucaria bidwillii*, Shannon 指数 0.6243)^[25]、智利南洋杉(*Araucaria araucana*, Shannon 指数 0.65)^[26]、黑云杉(*Picea mariana*, 未根据取样大小校正的总期望杂合度 $H_T = 0.328$, 校正后的总期望杂合度 $H_T = 0.330$)^[27]、扭叶松(*Pinus contorta*, $h = 0.143$)^[28]、北美短叶松(*Pinus banksiana*, $h = 0.156$)^[28]、卵果松(*Pinus oocarpa*, $h = 0.358$)^[29]、皮尔格柏(*Pilgerodendron wifurum*, Shannon 指数 0.730, $H_T = 0.712$)^[30]、智利柏(*Fitzroya cupressoides*, Shannon 指数

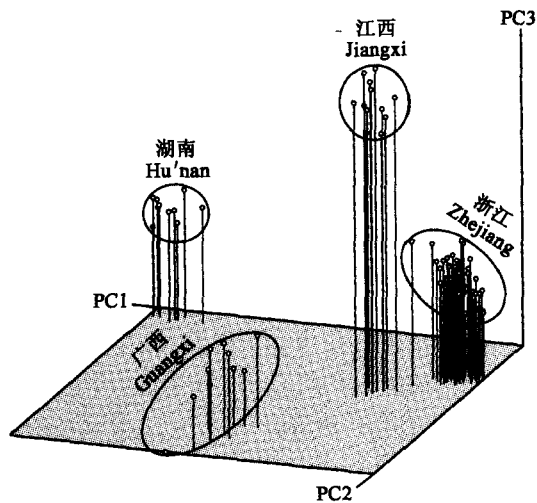


图3 基于 RAPD 表型特征的主成分分析(PCA)

Fig.3 Principal components analysis (PCA) based on RAPD phenotypic characters

0.547)^[31]、*Podocarpus salignus* (Shannon 指数 0.69)^[32] 以及至极端情形美加红松 (*Pinus resinosa*) 中未检测到多态性^[38]; 在物种水平上, 白豆杉的遗传变异水平 (Shannon 指数 0.2362、 $h = 0.2367$ 、 $H_T = 0.2094$) 相对偏低。从地史的角度看, 在新生代第三纪之前, 全球气候温暖湿润, 裸子植物极为繁盛; 但至约 250 万 a 前, 新生代第四纪冰期降临, 冰川由北极南下, 不少树种灭绝或南移^[39]。在我国不少山区未受冰川影响, 成为包括白豆杉在内的孑遗植物的“避难所”。和许多经历过种群退缩的树种一样, 可以推测瓶颈效应是导致白豆杉遗传变异偏低的重要因素^[30, 40, 41]。另一方面, 已经积累的等位酶资料显示, 和广布种相比, 分布范围狭窄的特有植物种因为遗传漂变对小种群的作用, 它们的多态性和杂合度水平普遍偏低^[31, 42~44]。白豆杉作为中国特有植物, 估计同样的原因也加剧了遗传多样性的减低。

此外, 根据地区水平上的统计结果 (表 3), 白豆杉分布于浙江的种群遗传多样性最高, 广西、江西种群依次随后, 而湖南种群的最低。浙江是白豆杉分布最集中、数量最多的省份^[10], 现存于该地的种群也相对最为连续。与此不同, 它生长在其他省份的种群不仅个体稀少, 而且大多呈零星、孤立状; 特别是位于广东北部的种群, 据我们的调查, 可能已经完全消失。以往针对松杉类植物的研究发现, 处在核心位置、连续分布的种群, 利用中性分子标记检测到的遗传变异通常比处在外围、间断分布的种群要高^[45, 46]。白豆杉种群的 RAPD 分析结果为该看法提供了进一步佐证。造成这种遗传变异分布格局, 一是因为较小种群受遗传漂变的影响更大, 而且它们之间的基因流也更低; 另一原因是核心种群和外围种群间缺乏基因流^[47, 48]。

揭示白豆杉现存天然种群的遗传变异式样对制定保育策略和管理方案具重要参考价值。由于白豆杉种群间已发生高度遗传分化, 所以建议在保育过程中尽量避免在种群之间实施种质迁移。这一方面是因为, 从位于他处的大种群向小种群迁移个体虽然可以在短期内增加小种群的遗传多样性, 但也同时可能重新恢复小种群中原本被清除掉的有害隐性等位基因或是引发远交衰退^[30, 49, 50]。另一原因是, 自然选择倾向于使种群适应当地条件, 而迁入个体引进的遗传物质适应的是另外不同的条件; 如有不慎, 有时会引发灾难性后果^[50]。因此, 为确保白豆杉适应当地条件, 最好不在分化显著的种群间人为移栽个体。本研究还发现白豆杉的遗传变异水平偏低, 这会影响物种的繁育和种群的生存能力^[51]。对于遗传变异水平最低、遗传关系也最为疏远的湖南张家界天子山种群 HNj (表 1, 图 2) 和个体数目仅存数株、地理位置极端隔离的江西井冈山轿子山种群 JXi, 在经费有限的情况下应该优先予以保护。最后, 必须强调的是, RAPD 分子标记进化上呈中性, 它检测到的结果主要反映的是遗传变异被动丢失的过程; 而对于涉及物种适合度的遗传变异的波动情况所能提供的信息则十分有限^[50, 52]。要制定更加理想的保育方案, 还需深入研究白豆杉中同繁殖和生存直接相关的一些数量遗传性状的变异式样, 种群内、种群间的基因流状况以及它们对繁殖与种口过程所产生的效应^[30, 53]。

References:

- [1] Rosseto M, Weaver P K, Dixon K W. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Molecular Ecology*, 1995, 4: 321 ~ 329.
- [2] Wang T, Su Y J, Li X Y, et al. Genetic structure and variation in the relict populations of *Alsophila spinulosa* from southern China based on RAPD markers and cpDNA atpB-rbcL sequence data. *Hereditas*, 2004, 140: 8 ~ 17.
- [3] Stewart C N, Excoffier L. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). *J. Evol. Biol.*, 1996, 9: 153 ~ 171.
- [4] Holsinger K E. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. *Hereditas*, 1999, 130: 245 ~ 255.
- [5] Holsinger K E, Lewis P O, Dey D K. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 1157 ~ 1164.
- [6] Wright S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 1951, 15: 323 ~ 354.
- [7] Malécot G. *Les Mathématiques D l'Hérédité*. Paris: Masson et Cie, 1948.
- [8] Fu L G, Li N, Mill R R. Taxaceae. In: Wu Z Y and Raven P H eds. *Flora of China*. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1999.
- [9] Fu L G, Jin J M. Red list of endangered plants in China (Volume 1). Beijing: Science Press, 1992.
- [10] Hu S Q, Chen Z H, Shun M J. A study on resources of *Pseudotsuga chinensis* (Cheng) Cheng. *J. Zhejiang Univ. (Agric. & Life Sci.)*, 2003, 29(1): 97 ~ 102.
- [11] Hamrick J L, Godt M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil. Trans. R. Soc. London B*, 1996, 351: 1291 ~ 1298.
- [12] Hilfiker K, Gugerli F, Schutz J, et al. Low RAPD variation and female-biased sex ratio indicate genetic drift in small populations of the dioecious conifer *Taxus baccata* in Switzerland. *Conserv. Genet.*, 2004, 5: 357 ~ 365.
- [13] Su Y J, Wang T, Yang W D, et al. DNA extraction and RAPD analysis of *Podocarpus*. *Acta. Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, 1998, 37(4): 13 ~ 18.
- [14] Holsinger K E, Wallace L E. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae).

- Mol. Ecol., 2004, 13: 887 ~ 894.
- [15] Holsinger K E, Lewis P O. Hickory: a package for analysis of population genetic data. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA, 2003.
 - [16] Yeh F C, Yang R. POPGENE version 1.31. Department of Renewable Resources, University of Alberta <http://www.ualberta.ca/~fyeh>, 1999.
 - [17] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin ver. 2.000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
 - [18] Rohlf F J. NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8. Exeter Software, NY, 1993.
 - [19] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70: 3321 ~ 3323.
 - [20] Wright S. Isolation by distance. Genetics, 1943, 28: 114 ~ 138.
 - [21] Wright S. The genetical structure of populations. Ann. Eug., 1951, 15: 323 ~ 354.
 - [22] Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution, 1965, 19: 395 ~ 420.
 - [23] Dawson I K, Simons A J, Waugh R, et al. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. Heredity, 1995, 74: 10 ~ 18.
 - [24] Meekins J F, Ballard H E, McCarthy B C. Genetic variation and molecular biogeography of a North American invasive plant species (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae). Int. J. Plant Sci., 2001, 162: 161 ~ 169.
 - [25] Pye M G, Gadek P A. Genetic diversity, differentiation and conservation in *Araucaria bidwillii* (Araucariaceae), Australia's Bunya pine. Conserv. Genet., 2004, 5: 619 ~ 629.
 - [26] Bekessy S A, Allnutt T R, Premoli A C, et al. Genetic variation in the Monkey Puzzle tree (*Araucaria araucana* (Molina) K. Koch), detected using RAPD. Heredity, 2002, 88: 243 ~ 249.
 - [27] Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 6369 ~ 6373.
 - [28] Ye T Z, Yang R C, Yeh F C. Population structure of a lodgepole pine (*Pinus contorta*) and jack pine (*P. banksiana*) complex as revealed by random amplified polymorphic DNA. Genome, 2002, 45: 530 ~ 540.
 - [29] Dfaz V, Muniz L M, Ferrer E. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. Mol. Ecol., 2001, 10: 2593 ~ 2603.
 - [30] Allnutt T R, Newton A C, Premoli A, et al. Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgerodendron wiiferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. Biol. Conserv., 2003, 114: 245 ~ 253.
 - [31] Allnutt T R, Newton A C, Lara A, et al. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. Mol. Ecol., 1999, 8: 975 ~ 987.
 - [32] Allnutt T R, Courtis J R, Gardner M, et al. Genetic variation in wild Chilean and cultivated British populations of *Podocarpus salignus* D. Don (Podocarpaceae). Edin. J. Bot., 2001, 58: 459 ~ 473.
 - [33] Hilfiker K, Holderegger R, Rotach P, et al. Dynamics of genetic variation in *Taxus baccata*: local versus regional perspectives. Can. J. Bot., 2004, 82: 219 ~ 227.
 - [34] Cheng Y C, Nicolson R G, Tripp K, et al. Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. Mol. Phylogenet. Evol., 2000, 14: 353 ~ 365.
 - [35] Conner J K, Hartl D L. A Primer of Ecological Genetics. Sunderland: Sinauer Associates, 2004.
 - [36] Nybom H, Bartish I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Persp. Plant Ecol. Evol. Syst., 2000, 3/2: 93 ~ 114.
 - [37] Thomas P A, Polwart A. *Taxus baccata* L. J. Ecol., 2003, 91: 489 ~ 524.
 - [38] Mosseler A, Innes D J, Roberts B A. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. Can. J. Forest Res., 1992, 22: 1332 ~ 1337.
 - [39] Qin G F. Geographical origin and evolution of Masson pine. Forest Research, 2002, 15(4): 406 ~ 412.
 - [40] Walter R, Epperson B K. Geographic pattern of genetic variation in *Pinus resinosa*: area of greatest diversity is not the origin of postglacial populations. Molecular Ecology, 2001, 10: 103 ~ 111.
 - [41] Peakall R, Ebert D, Scott L J, Meagher P F, Offord C A. Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollemia nobilis* (Araucariaceae). Mol. Ecol., 2003, 12: 2331 ~ 2343.
 - [42] Hamrick J L, Godt M J. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, Weir B S eds. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland: Sinauer Associates, 1989. 43 ~ 63.
 - [43] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests, 1992, 6: 95 ~ 124.
 - [44] Frankham R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. Conserv. Biol., 1996, 10: 1500 ~ 1508.
 - [45] Aitken S N, Libby W T. Evolution of the pygmy-forest edaphic subspecies of *Pinus contorta* across an ecological staircase. Evolution, 1994, 48: 1009 ~ 1019.
 - [46] Ledig F T. Founder effects and genetic structure of Coulter Pine. J. Heredity, 2000, 91: 307 ~ 315.
 - [47] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, 1975, 29: 1 ~ 10.
 - [48] Hartl D L, Clark G C. Principles of Population Genetics. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 542.
 - [49] Ennos R A. Genetic constraints on native woodland restoration. In: Newton A C, Ashmole P eds. Native Woodland Restoration in Southern Scotland: Principles and Practice. Ancrum: Borders Forest Trust, 1998. 27 ~ 34.
 - [50] Amos W, Balmford A. When does conservation genetics matter? Heredity, 2001, 87: 257 ~ 265.
 - [51] Sherwin W B, Moritz C. Managing and monitoring genetic erosion. In: Young A G, Clarke G M eds. Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 9 ~ 34.
 - [52] Bachmann K. Nuclear DNA markers in plant biosystematic research. Oper. Bot., 1997, 132: 137 ~ 148.
 - [53] Ennos R A. Utilising genetic information in plant conservation programme. In: Hochberg M E, Clobert J, Barbault R eds. Aspects of the Genesis and Maintenance of Biological Diversity. Oxford: Oxford University Press, 1996. 278 ~ 291.

参考文献:

- [9] 傅立国,金鉴明. 中国植物红皮书——稀有濒危植物.(第一册).北京:科学出版社,1992.
- [10] 胡绍庆,陈征海,孙孟军. 浙江省白豆杉资源调查研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2003, 29(1): 97 ~ 102.
- [39] 秦国峰. 马尾松地理起源及进化繁衍规律的探讨. 林业科学研究,2002, 15(4): 406 ~ 412.